



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1864746 B

(45) 授权公告日 2010.05.12

(21) 申请号 200610054358.8

审查员 潘爱群

(22) 申请日 2006.06.14

(73) 专利权人 中国人民解放军第三军医大学
地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街
30号

(72) 发明人 邹全明 张卫军 杨珺 毛旭虎
郭刚 童文德 吴超 郭鹰
刘开云 解庆华

(74) 专利代理机构 重庆志合专利事务所 50210
代理人 胡荣瑛

(51) Int. Cl.

A61K 39/02(2006.01)

A61P 1/04(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

(56) 对比文件

曾浩等. 幽门螺杆菌代谢组学研究进展. 世界华人消化杂志 13 20. 2005, 13(20), 全文.

权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图 3 页

(54) 发明名称

幽门螺杆菌 AhpC-NapA 融合基因工程多价亚单位疫苗及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种幽门螺杆菌 AhpC-NapA 融合基因工程多价亚单位疫苗及其制备方法。该疫苗选用烷基过氧化氢还原酶 (AhpC) 与中性粒细胞激活蛋白 NapA 的融合基因作为活性成分, 辅以分子内或分子外佐剂, 如大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 LTB、霍乱毒素 B 亚单位 CTB 等, 构建获得基因工程重组多价组合疫苗。该基因工程疫苗构建方法独特, 制备工艺简捷、容易放大、重复性好, 所获疫苗蛋白纯度高, 动物试验证明可有效刺激机体产生较高的免疫应答和免疫保护作用。

1. 一种幽门螺杆菌 AhpC-NapA 融合基因工程多价亚单位疫苗,其特征在於该疫苗的活性成分是将幽门螺杆菌抗原组分 AhpC 与中性粒细胞激活蛋白 NapA 通过接头序列连接在一起而得到的融合蛋白质。

2. 一种幽门螺杆菌 AhpC-NapA 融合基因工程多价亚单位疫苗,其特征在於该疫苗的活性成分是将幽门螺杆菌抗原组分 AhpC 与中性粒细胞激活蛋白 NapA 的融合蛋白与佐剂成分 LTB 或 CTB 在基因水平上通过接头序列融合在一起形成的分子内佐剂基因工程重组融合蛋白质。

3. 根据权利要求 2 所述的幽门螺杆菌 AhpC-NapA 融合基因工程多价亚单位疫苗,其特征在於该疫苗的活性成分是将幽门螺杆菌抗原组分 AhpC 与中性粒细胞激活蛋白 NapA 的融合蛋白与佐剂成分 LTB 或 CTB 通过物理混合制备的分子外佐剂疫苗。

4. 采用幽门螺杆菌 AhpC-NapA 融合基因制备的疫苗制剂,其特征在於该疫苗由根据权利要求 1-2 中任一项的基因工程疫苗活性成分以及一种或多种疫苗制剂中可接受的稀释剂和载体组成。

5. 制备权利要求 2 中的基因工程多价亚单位疫苗的方法,主要包括以下步骤:

(1) 提供幽门螺杆菌 AhpC、NapA 保护性抗原以及大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 LTB、霍乱毒素 B 亚单位 CTB 目的基因的 PCR 扩增、基因克隆与序列分析;

(2) 将步骤 (1) 的幽门螺杆菌 AhpC 与 NapA、大肠杆菌不耐热肠毒 B 亚单位 LTB、霍乱毒素 B 亚单位 CTB 全基因或各自的功能片段连接到原核表达质粒或多基因融合表达质粒中;

(3) 用步骤 (2) 的得到的重组表达质粒转化适当的宿主细菌细胞,得到基因过程重组菌株;

(4) 在适于表达所需蛋白质的条件下,大规模发酵培养步骤 (3) 的基因工程重组菌株;

(5) 分离并纯化步骤 (4) 产生的重组蛋白质,即得到幽门螺杆菌 AhpC 基因工程疫苗。

6. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征是在步骤 (1) 中,克隆 AhpC、NapA、LTB、CTB 基因使用的引物是:

AhpC P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAAGCTTGCC-3'

Nde I

P2 5' -CGCTCGAGAAGCTTAATGGAAT-3'

XhoI

P2' 5' -GCTACCTCCGCCTCCAAGCTTAATGGAAT

Linker

NapA P3 5' -CATATGAAAACATTTGAAATT-3'

NdeI

P3' 5' -TGGAGGCGGAGGTAGCAAAACATTTGAAATT-3'

linker

P4 5' -CTCGAGAGCCAAATGGGCTTCTAG-3'

XhoI

P4' 5' -GCTACCTCCTCCACTTCCGCCTCCAGCCAAATGGGCTTCTAG-3'

linker

LTB P5 5' -CCATGGCTCCCCAGTCTATTAC-3'

NcoI

P5' 5' -GGAGGCGGAAGTGGAGGAGGTAGCGCTCCCCAGTCTATT-3'

linker

P5" 5' -GGAGGCGGAGGTAGCGCTCCCCAGTCTATT-3'

linker

P6 5' -CTCGAGGTTTTCCATGCTGATTGC-3'

XhoI

CTB P7 5' -CATATGATTAAATTAAAAATTTG-3'

NcoI

P7' 5' -GGAGGCGGAAGTGGAGGAGGTAGCATTAAATTAAAAATTTGGT-3'

linker

P7" 5' -GGAGGCGGAGGTAGCATTAAATTAAAAATTTGGT-3'

linker

P8 5' -CTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG-3'

XhoI

7. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征是步骤 (2) 中构建融合基因使用的合成引物是:

P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAACTTGCC-3'

Nde I

AhpC

P2 5' -CGCTCGAGTTAAAGCTTAATGGAAT-3'

XhoI

P3 5' -CATATGAAAACATTTGAAATT-3'

NdeI

NapA

P4 5' -CTCGAGAGCCAAATGGGCTTCTAG-3'

XhoI

P5 5' -CCATGGCTCCCCAGTCTATTAC-3'

NcoI

LTB

P6 5' -CTCGAGGTTTTCCATGCTGATTGC-3'

XhoI

P7 5' -CATATGATTAAATTAAAAATTTG-3'

NcoI

CTB

P8 5' -CTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG-3'

XhoI

P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAACTTGCC-3'

AhpC-LTB

- Nde I
- P6 5' -CTCGAGGTTTTCCATGCTGATTGC-3'
XhoI
- P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAAGTTGCC-3'
Nde I
- AhpC-CTB
- P8 5' -CTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG-3'
XhoI
- P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAAGTTGCC-3'
Nde I
- AhpC-NapA
- P4 5' -CTCGAGAGCCAAATGGGCTTCTAG-3'
XhoI
- P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAAGTTGCC-3'
Nde I
- AhpC-NapA-LTB
- P6 5' -CTCGAGGTTTTCCATGCTGATTGC-3'
XhoI
- P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAAGTTGCC-3'
Nde I
- AhpC-NapA-CTB
- P8 5' -CTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG-3'
XhoI

幽门螺杆菌 AhpC-NapA 融合基因工程多价亚单位疫苗及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物制药领域,涉及用于人幽门螺杆菌感染免疫和治疗的基因工程疫苗及其多价亚单位疫苗制备方法。

背景技术

[0002] 幽门螺杆菌 (*helicobacter pylori*, *H. pylori*) 是定植于人胃粘膜并引起胃、十二指肠疾病的革兰阴性杆菌,全世界约 50% 以上的人口胃部感染幽门螺杆菌,并且大多在儿童时期获得,如不治疗将持续感染,引发慢性胃炎、消化性溃疡,甚至导致胃癌。自 1983 年 Warren 和 Marshall 发现幽门螺杆菌以来,人们一直致力于这一细菌的研究,世界卫生组织和美国国立卫生研究院经过多年的分析研究,正式将 *H. pylori* 列为胃癌的首要致癌因子。现在临床多以质子泵抑制剂加抗生素或铋盐的三联疗法、四联疗法治疗,这种治疗方案具有一定效果但也必须面对引发的一些问题,诸如治疗费用昂贵、不良反应大、病人的依从性及抗生素的耐药性和再次感染等。因此研制一种有效的疫苗可能是预防和治疗幽门螺杆菌感染所致消化道疾病的有效途径。

[0003] 但是 Hp 菌体培养条件苛刻,难以进行大规模培养。细菌抗原组分复杂,且含量较低,直接从全菌中分离纯化出保护性抗原的难度较大,方法繁琐,不利于疫苗的产业化制备。利用基因工程技术将菌体有效的保护性抗原进行克隆表达使 Hp 疫苗研制的可行性大大提高,其中基因工程尿素酶亚单位疫苗已进入 III 期临床试验阶段。与此同时,多亚单位融合蛋白疫苗也越来越受到人们的关注。Ruggiero 等认为在细菌感染过程中,由于宿主和致病菌之间有着复杂的作用机制,单一抗原组分构建的疫苗难以产生完全有效的保护作用,在 Hp 单个保护性抗原疫苗研究基础上,构建的多亚单位疫苗具有 Hp 多个抗原组分,能够激发机体产生比单一亚单位成分更强的免疫反应,抗原成分相对于全菌疫苗更为简单,能够减少机体变态反应的发生。

[0004] 革兰氏阴性细菌外膜蛋白具有良好的抗原活性,这些外膜蛋白作为抗体和免疫细胞攻击的主要靶标,可以介导对细菌最直接有效的杀灭作用,是决定免疫反应是否对人体具有保护性的关键因素。新近研究证明,在 Hp 所有炎性作用因子中,氧化应激是造成胃部炎症的重要致病因子。Hp 诱导的氧化应激可以造成宿主细胞的损伤,同时也要面对宿主吞噬细胞释放的氧自由基的攻击。Hp 必须具有一种保护机制防御氧化应激,烷基过氧化氢还原酶 (AhpC) 就是一种重要的抗氧化酶,预防 Hp 在氧冲击下带来的损伤。

[0005] 胃黏膜感染 Hp 以中性粒细胞和单核细胞浸润为特征,其损害程度与中性粒细胞浸润密切相关 (Bayerdorffer E, Lehn N, Hatz R, et al. Difference in expression of *Helicobacter pylori* gastritis in antrum and body. *Gastroenterology*, 1992, 102:1575-1582)。早期研究发现, Hp 水提取物中有一种或几种蛋白成分具有直接吸引和激活中性粒细胞及其他炎症细胞的作用。由此提纯一相对分子质量为 15KDa, 具有促进中性粒细胞粘附内皮细胞及诱导中性粒细胞产生反应性氧自由基的物质,命名为

NAP (Evans DJ Jr, Evans DG, Takemura T, et al. Characterization of a Helicobacter pylori neutrophil activating protein. *Infect Immun*, 1995, 63:2213-2220)。HP-NAP 位于 Hp 菌体内,通过自溶释放后,结合于细菌表面,起到粘附素的作用,介导与粘蛋白的结合 (Namavar F, Sparrius M, Veerman EC, et al. Neutrophil-activating protein mediates adhesion of Helicobacter pylori to sulfated carbohydrates on high molecular weight salivary mucin. *Infect Immun*, 1998, 66:444-447。),或者与多形核白细胞神经鞘磷脂结合。亦可促进单核细胞组织因子合成和纤维蛋白溶酶原激活剂抑制剂-2 的分泌。通过诱导细胞前凝血质和抗纤溶活性的协同表达,HP-NAP 可促进纤维蛋白沉积和由 Hp 引起的胃黏膜炎症反应 (Montemurro P, Barbuti G, Dundon WG, et al. Helicobacter pylori neutrophil activating protein stimulates tissue factor and plasminogen activator inhibitor production by human blood mononuclear cells. *J Infect Dis*, 2001, 183:1055-1062。)

[0006] AhpC 和 NapA 都是 Hp 的外膜蛋白成分,其编码基因具有高度保守性,是 Hp 疫苗重要的候选抗原。目前尚未见使用幽门螺杆菌外膜抗原 AhpC 作为免疫原性材料,特别是使用 AhpC 和 NapA 的融合蛋白作为免疫原性材料制备幽门螺杆菌多价疫苗的报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的针对现有疫苗存在的不足,旨在提供一种高效安全的 HpAhpC-NapA 融合基因工程多价亚单位疫苗及其制备方法。

[0008] 该疫苗采用烷基过氧化氢酶 AhpC 及其与中性粒细胞激活蛋白 NapA 的融合蛋白,获得单个重组蛋白和融合重组蛋白,再与佐剂成分,如大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 (LTB)、霍乱毒素 B 亚单位 CTB 或铝盐佐剂等,以不同组合方式(蛋白物理性混合或基因水平融合等)制备出不同类型(分子外佐剂或分子内佐剂)的 Hp 基因工程疫苗。

[0009] 为了得到本发明的幽门螺杆菌 AhpC-NapA 融合基因工程疫苗,可以针对 Hp 保护性抗原成分烷基过氧化氢酶 AhpC 进行单基因克隆,获得单个重组蛋白。以其作为基本活性成分,再以不同的组合方式与佐剂成分,如大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 LTB、霍乱毒素 B 亚单位 CTB 等,以适当比例进行物理性混合制备出 Hp 多价组合疫苗,用于粘膜途径免疫接种。动物试验结果显示:不同类型疫苗以不同接种方式免疫后均激发较强的系统免疫和粘膜免疫,获得较好的免疫保护效果。

[0010] 或者,将烷基过氧化氢酶 AhpC、NapA 进行基因水平连接,构建表达重组融合蛋白,并在此基础上与大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 LTB、霍乱毒素 B 亚单位 CTB 及铝盐佐剂等佐剂成分按照适当比例物理混合制备出不同分子外佐剂的基因工程重组多价融合蛋白疫苗。该疫苗适用于粘膜途径免疫接种,可激发产生较强的粘膜免疫和系统免疫应答,达到免疫预防和治疗 Hp 感染的目的。

[0011] 因此,作为本发明幽门螺杆菌 AhpC-NapA 基因工程疫苗的活性成分,是将幽门螺杆菌抗原组分 AhpC 与 NapA 通过接头序列连接在一起所得到的融合蛋白质。或者是将幽门螺杆菌抗原组分 Ahp 与 NapA 的融合基因与佐剂成分 LTB 或 CTB 在基因水平上通过接头序列融合在一起形成的分子内佐剂基因工程重组融合蛋白质。

[0012] 可以使用本领域技术人员熟知的方法(参见 Sambrook, ed. *Molecular Cloning* :

A Laboratory Manul(2nd.ed.), Vols.1-3, Cold Spring Harbor Laboratory(1998) ; Current Protocols In Molrcular Biology, Ausubel, ed. John wiley & Sons, Inc. New York(1997)), 制备本发明的加有分子内佐剂的幽门螺杆菌 AhpC-NapA 融合基因工程疫苗。例如, 可以将烷基过氧化氢酶 AhpC、NapA 在接头序列的连接下, 于基因水平上融合佐剂成分大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 (LTB) 或霍乱毒素 B 亚单位 CTB, 构建表达重组融合蛋白, 制备出分子内佐剂多价融合蛋白疫苗。简单的说, 该方法包括以下步骤:

[0013] (1) 提供幽门螺杆菌 AhpC、NapA 保护性抗原以及大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 LTB、霍乱毒素 B 亚单位 CTB 目的基因的 PCR 扩增、基因克隆与序列分析;

[0014] (2) 将步骤 (1) 的幽门螺杆菌 AhpC 与 NapA、大肠杆菌不耐热肠毒 B 亚单位 LTB、霍乱毒素 B 亚单位 CTB 全基因或各自的功能片段连接到原核表达质粒或多基因融合表达质粒中;

[0015] (3) 用步骤 (2) 的得到的重组表达质粒转化适当的宿主细菌细胞, 得到基因过程重组菌株,

[0016] (4) 在适于表达所需蛋白质的条件下, 大规模发酵培养步骤 (3) 的基因工程重组菌株;

[0017] (5) 分离并纯化步骤 (4) 产生的重组蛋白质, 即得到幽门螺杆菌 AhpC 基因工程疫苗。

[0018] 根据本发明的一个优选实施方案, 所说的步骤 1 中克隆 AhpC、NapA、LTB、CTB 基因所使用的引物分别是:

[0019] AhpC P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAACCTTGCC-3'

[0020] Nde I

[0021] P2 5' -CGCTCGAGAAGCTTAATGGAAT-3'

[0022] XhoI

[0023] P2' 5' -GCTACCTCCGCCTCCAAGCTTAATGGAAT

[0024] Linker

[0025] NapA P3 5' -CATATGAAAACATTTGAAATT-3'

[0026] NdeI

[0027] P3' 5' -TGGAGGCGGAGGTAGCAAAACATTTGAAATT-3'

[0028] linker

[0029] P4 5' -CTCGAGAGCCAATGGGCTTCTAG-3'

[0030] XhoI

[0031] P4' 5' -GCTACCTCCTCCACTTCCGCCTCCAGCCAAATGGGCTTCTAG-3'

[0032] linker

[0033] LTB P5 5' -CCATGGCTCCCCAGTCTATTAC-3'

[0034] NcoI

[0035] P5' 5' -GGAGGCGGAAGTGGAGGAGGTAGCGCTCCCCAGTCTATT-3'

[0036] linker

[0037] P5'' 5' -GGAGGCGGAGGTAGCGCTCCCCAGTCTATT-3'

[0038] linker

- [0039] P6 5' -CTCGAGGTTTTCCATGCTGATTGC-3'
 [0040] XhoI
 [0041] CTB P7 5' -CATATGATTAAATTTAAAATTTG-3'
 [0042] NcoI
 [0043] P7' 5' -GGAGGCGGAAGTGGAGGAGGTAGCATTAAATTTAAAATTTGGT-3'
 [0044] linker
 [0045] P7" 5' -GGAGGCGGAGGTAGCATTAAATTTAAAATTTGGT-3'
 [0046] linker
 [0047] P8 5' -CTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG-3'
 [0048] XhoI

[0049] 根据本发明的一个另优选实施方案,所说的步骤 2 中构建融合基因所使用的合成引物分别是:

- [0050] P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAACTTGCC-3'
 [0051] Nde I
 [0052] AhpC
 [0053] P2 5' -CGCTCGAGTTAAAGCTTAATGGAAT-3'
 [0054] XhoI
 [0055] P3 5' -CATATGAAAACATTTGAAATT-3'
 [0056] NdeI
 [0057] NapA
 [0058] P4 5' -CTCGAGAGCCAAATGGGCTTCTAG-3'
 [0059] XhoI
 [0060] P5 5' -CCATGGCTCCCCAGTCTATTAC-3'
 [0061] NcoI
 [0062] LTB
 [0063] P6 5' -CTCGAGGTTTTCCATGCTGATTGC-3'
 [0064] XhoI
 [0065] P7 5' -CATATGATTAAATTTAAAATTTG-3'
 [0066] CTB
 [0067] NcoI
 [0068] P8 5' -CTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG-3'
 [0069] XhoI
 [0070] P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAACTTGCC-3'
 [0071] NdeI
 [0072] AhpC-LTB
 [0073] P6 5' -CTCGAGGTTTTCCATGCTGATTGC-3'
 [0074] XhoI
 [0075] P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAACTTGCC-3'
 [0076] NdeI

[0077]	AhpC-CTB		
[0078]		P8	5' - <u>CTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG</u> -3'
[0079]			XhoI
[0080]		P1	5' - <u>CGCATATGTTAGTTACAAA</u> ACTTGCC-3'
[0081]			NdeI
[0082]	AhpC-NapA		
[0083]		P4	5' - <u>CTCGAGAGCCAAATGGGCTTCTAG</u> -3'
[0084]			XhoI
[0085]		P1	5' - <u>CGCATATGTTAGTTACAAA</u> ACTTGCC-3'
[0086]			Nde I
[0087]	AhpC-NapA-LTB		
[0088]		P6	5' - <u>CTCGAGGTTTTCCATGCTGATTGC</u> -3'
[0089]			XhoI
[0090]		P1	5' - <u>CGCATATGTTAGTTACAAA</u> ACTTGCC-3'
[0091]			NdeI
[0092]	AhpC-NapA-CTB		
[0093]		P8	5' - <u>CTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG</u> -3'
[0094]			XhoI

[0095] 根据本发明的再一个优选实施方案,所说的步骤4中纯化融合蛋白所用的阴离子填料选自 Q Sepharose HP、Q Sepharose FF 或 Q Sepharose XL;镍离子亲和纯化填料选自 Chelating Sepharose HP 或 Chelating Sepharose FF;凝胶过滤层析柱填料选自 Superdex 75、Superdex200 或 Superdex HR 10/30。

[0096] 本发明的疫苗可通过粘膜途径(胃肠粘膜、鼻粘膜等)进行免疫接种,激发机体产生高滴度 sIgA 和较强的粘膜免疫应答以及一定的系统免疫应答。

[0097] 我们的动物试验结果表明,本发明的单价或多价疫苗具有良好的抗 Hp 感染的免疫预防效果和清除 Hp 感染的免疫治疗作用。

[0098] 本发明的基因工程重组蛋白的表达与基本特性:①本发明中所构建的重组表达质粒均在原核表达系统-大肠杆菌中诱导表达。②重组蛋白 AhpC 的表达率约为 37%;重组融合蛋白 AhpC-LTB 表达率约 34%,重组融合蛋白 AhpC-NapA-LTB 表达率约 30%,重组融合蛋白 AhpC-CTB 表达率约 31%,重组融合蛋白 AhpC-NapA-CTB 表达率约 25%;③各重组蛋白均以包涵体形式表达,纯化后的纯度大于 80%。④各重组蛋白均能够诱导动物产生较高滴度的特异抗体。

[0099] 本发明采用基因工程技术克隆表达保护性抗原成分,表达量高,便于分离纯化,而且高效安全。该重组蛋白可以直接与佐剂(LTB、CTB)结合,制备出多种分子外佐剂或分子内佐剂疫苗,形式灵活多样,适用于不同免疫接种方法和途径。

附图说明

[0100] 图1显示基因组抽提琼脂糖电泳结果。核酸(DNA)分子量标准(Marker);泳道2为 Hp 基因组 DNA。

[0101] 图 2 显示 *ahpC* 基因 PCR 扩增结果。泳道 1 为核酸 (DNA) 分子量标准 (Marker) ; 泳道 2 为目的基因 *ahpC* 的 PCR 扩增产物 (594bp)。图示结果表明, 目的基因 *ahpC* 的 PCR 扩增是成功的。

[0102] 图 3 显示克隆载体 pMD-18-*ahpC* 的切鉴定结果。泳道 1 为核酸 (DNA) 分子量标准 (Marker) ; 泳道 2 为阴性克隆子酶切结果 ; 泳道 3、4 为阳性克隆子酶切结果 (594bp)。图示结果表明, 酶切的 *ahpC* 基因片段大小与预计一致, 表明 T 载体克隆成功。

[0103] 图 4 显示表达载体 pET22b-*ahpC* 的切鉴定结果。泳道 1 为 pET22b 阳性克隆子 ; 泳道 2 为核酸 (DNA) 分子量标准 (Marker)。图示结果表明, 酶切的 *ahpC* 基因片段大小与预计一致, 表明表达载体的克隆是成功的。

[0104] 图 5 显示 SDS-PAGE 检测 rAhpC 蛋白表达。其中泳道 1 为种子菌 ; 泳道 2 为 pET22b/BL21 ; 泳道 3 为重组 pET22b-*ahpC*/BL21 诱导 2 小时 ; 泳道 4 为重组 pET22b-*ahpC*/BL21 诱导 4 小时 (h) ; 泳道 5 为重组 pET22b-*ahpC*/BL21 诱导 6h ; 泳道 6 为重组 pET22b-*ahpC*/BL21 诱导 8h ; 泳道 7 为蛋白分子量标准。图示结果显示, 经 UVP 扫描分析目的蛋白表达量为 37.6%。

[0105] 图 6 显示 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定 rAhpC 蛋白的表达形式。其中泳道 1 为重组工程菌 ; 泳道 2 为工程菌超声沉淀 ; 泳道 3 为工程菌超声上清 ; 泳道 4 至 7 为包涵体洗涤 ; 泳道 8 为 AhpC 包涵体 ; 泳道 9 为蛋白分子量标准。

[0106] 图 7 显示 *napA*、*ahpC*、*1tB* 基因 PCR 扩增结果。其中泳道 1 为核酸分子量标准 (Marker) ; 泳道 2 为目的基因 *napA* 的 PCR 扩增产物 (432bp) ; 泳道 3 为目的基因 *ahpC* 的 PCR 扩增产物 (594bp) ; 泳道 4 为目的基因 *1tB* 的 PCR 扩增产物 (309bp)。图示的结果表明, 目的基因 *napA*, *ahpC* 和 *1tB* 的 PCR 克隆扩增效果良好。

[0107] 图 8 显示融合基因 *ahpC*-*1tB* 重叠延伸 PCR 电泳结果 (918bp)。其中泳道 1 为核酸分子量标准 (Marker) ; 泳道 2 为融合基因 *ahpC*-*1tB* 的 PCR 扩增产物。由图示结果可以看出, 融合基因片段大小与预计一致, 表明重叠延伸得到融合基因。

[0108] 图 9 显示 *ahpC* 基因片段、*napA*-*1tB* 融合基因 PCR 电泳结果。其中泳道 1 为核酸分子量标准 (Marker) ; 泳道 2 为目的基因 *ahpC* 的 PCR 扩增产物 ; 泳道 3 为融合基因 *napA*-*1tB* 的 PCR 扩增产物。

[0109] 图 10 显示融合基因 *ahpC*-*napA*-*1tB* 重叠延伸 PCR 电泳结果。其中泳道 1 为融合基因 *ahpC*-*napA*-*1tB* 的 PCR 扩增产物 ; 泳道 2 为核酸分子量标准 (Marker)。由图示结果可以看出, 融合基因片段大小与预计一致, 表明重叠延伸得到融合基因。

[0110] 图 11 显示重组质粒 pMD18-T-ANL 的切鉴定结果。其中泳道 1 为核酸分子量标准 (Marker) ; 泳道 2、4 为阴性克隆子酶切结果 ; 泳道 3 为阳性克隆子酶切结果。由图示结果可以看出, 酶切基因片段大小与理论值一致, 表明 T 载体克隆成功。

[0111] 图 12 显示重组质粒 pET22b-ANL 的切鉴定结果。其中泳道 1 为阳性克隆子酶切结果。其中泳道 2 为核酸分子量标准 (Marker)。图中显示酶切基因片段大小与理论值一致, 表明表达载体克隆成功。

[0112] 图 13 显示以 SDS-PAGE 方法检测 rANL 蛋白表达。其中泳道 1 为种子菌 ; 泳道 2 为 pET22b/BL21 ; 泳道 3 为重组 pET22b-ANL/BL21 诱导 2 小时 ; 泳道 4 为重组 pET22b-ANL/BL21 诱导 4 小时 ; 泳道 5 为重组 pET22b-ANL/BL21 诱导 6 小时 ; 泳道 6 为蛋白分子量标准。结果显示经 UVP 扫描分析目的蛋白表达量为 32.7%。

[0113] 图 14 显示 rANL 表达形式鉴定实验结果。其中泳道 1 为重组工程菌；泳道 2 为工程菌超声沉淀；泳道 3 为工程菌超声上清；泳道 4-7 为包涵体洗涤；泳道 8 为 rANL 包涵体；泳道 9 为蛋白分子量标准。

[0114] 图 15 显示蛋白抗原质量鉴定图 (SDS-PAGE)。其中泳道 1 为蛋白分子量标准；泳道 2 为 rAhpC；泳道 3 为 rANL。

具体实施方式

[0115] 下面结合附图及实施例对本发明作详细描述本发明。

[0116] 实施例 1 幽门螺杆菌 AhpC、NapA 编码基因及分子外佐剂 LTB、CTB 基因的克隆

[0117] 1. 幽门螺杆菌来源于西南医院消化科病人临床分离株 (菌株编号 :CQ9803)

[0118] 2. 液氮罐中取出保存的 Hp 菌株 (CQ 9803) 涂布于 Hp 专用固体培养基上, 于 37°C, 含 5% O₂, 85% N₂, 10% CO₂ 条件下培养 72h。基因组抽提试剂盒抽提 Hp 基因组 (附图 1 所示)。

[0119] 3. 采用 PCR 方法自 Hp 基因组分别扩增 AhpC 和 NapA 的编码基因。

[0120] 1) 引物设计合成如下 (下划线示酶切位点及接头 (linker) 碱基序列)

[0121] 根据 GenBank 公布的基因序列及引物设计原则, 设计相应的引物, 引入酶切位点。在中间引入下列接头 (linker) 序列。

[0122] 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAAGCTTGCC-3'

[0123] P1

[0124] Nde I

[0125] AhpC

[0126] 5' -CGCTCGAGTTAAAGCTTAATGGAAT-3'

[0127] P2

[0128] XhoI

[0129] 5' -CATATGAAAACATTTGAAATT-3'

[0130] NapA P3

[0131] NdeI

[0132] 5' -CTCGAGAGCCAAATGGGCTTCTAG-3'

[0133] P4

[0134] XhoI

[0135] P5 5' -CCATGGCTCCCCAGTCTATTAC-3'

[0136] NeoI

[0137] LTB

[0138] P6 5' -CTCGAGGTTTTCCATGCTGATTGC-3'

[0139] XhoI

[0140] P7 5' -CATATGATTAAATTTAAATTTG-3'

[0141] NcoI

[0142] CTB

[0143] P8 5' -CTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG-3'

[0144] XhoI

[0145] 2) 目的基因的 PCR 扩增：

[0146] 以幽门螺杆菌基因组 DNA 为模板，P1 和 P2，P3 和 P4 引物分别扩增 AhpC、NapA 基因，以野生型产毒大肠杆菌 H44815 基因组 DNA 为模板以 P5 和 P6 引物扩增 LTB 基因，以霍乱弧菌（埃尔托生物型）基因组 DNA 为模板，P7 和 P8 引物扩增 CTB 基因，采用如下 PCR 体系和程序（PCR 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司产品）：

[0147] 模板 DNA 1 μ l；10 \times PCR 缓冲液（含氯化镁）5 μ l；dNTPs (10mmol/L) 4 μ l；上、下游引物 (0.025mmol/L) 各 1 μ l；Taq DNA 聚合酶 (5u/ μ l) 0.5 μ l，加去离子水至终体积 50 μ l。将反应体系混匀，离心处理后，加入 30 μ l 石蜡油。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟，94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒，60 $^{\circ}$ C 退火 40 秒，72 $^{\circ}$ C 延伸 40 秒，35 个循环，72 $^{\circ}$ C 完全延伸 10 分钟。反应完毕后取 1 μ l 反应产物，1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 效果。

[0148] 3) PCR 产物的回收（回收试剂盒购自北京天为时代公司，按试剂盒使用说明书操作）

[0149] (1) 灌制 1.0% 的琼脂糖凝胶；

[0150] (2) 将 PCR 扩增产物加入电泳上样孔中，指示剂迁移至适当位置时停止电泳；

[0151] (3) 在紫外线灯下分离含目的片段的凝胶，移入 1.5ml EP 管；

[0152] (4) 加入 DNA 结合缓冲液（北京天为时代公司回收试剂盒），65 $^{\circ}$ C 水浴使凝胶完全溶化并保持溶液 pH 在 5.0 ~ 6.0 之间；

[0153] (5) 将溶胶液移入分离管，12000g 离心 1 分钟，弃去收集管中的液体；

[0154] (6) 加入 500 μ l 洗涤缓冲液（北京天为时代公司回收试剂盒），12000g 离心 1 分钟，弃去收集管中的液体；

[0155] (7) 重复步骤 (6)；

[0156] (8) 12000g 离心 1 分钟，分离管移置另一干净 1.5ml EP 管，加入 20 μ l 的 TE 缓冲液，65 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟，12000g 离心 1 分钟，取 2 μ l 电泳，UVP 紫外扫描检查回收效果。

[0157] 4. PCR 产物的克隆

[0158] 1) 连接反应

[0159] 根据 PCR 回收产物浓度分别与 pMD18-T 载体按外源片段与载体摩尔数比为 1 : 2 ~ 10 的原则，设计连接反应体系如下：(PCR 试剂盒和 pMD18-T 载体试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司，按试剂盒使用说明书操作)

[0160] 目的片段连接：

回收片段(200ng/μl)	1μl
pMD18-T(50ng/μl)	1μl
ddH ₂ O	3μl
连接溶液(大连 TaKaRa 公司 pMD18-T 载体试剂盒)	5μl
总体积	10μl

[0161] 对照插入段 (Control insert) DNA 的连接:

对照插入物 DNA(50ng/μl)	1μl
pMD18-T(50ng/μl)	1μl
ddH ₂ O	3μl
连接溶液(大连 TaKaRa 公司 pMD18-T 载体试剂盒)	5μl
总体积	10μl

[0162] 16°C 连接 3 小时。

[0163] 2) 连接产物转化及重组子的筛选、鉴定

[0164] (1) 大肠杆菌 DH5 α 感受态菌的制备 (CaCl₂ 法)

[0165] 无菌接种环蘸取 -70°C 冻存的 DH5 α 保种液, 三线法划线接种于 LB 平板, 37°C 培养 12 ~ 16 小时。

[0166] 挑取单个菌落接种于 2ml LB 培养液中, 37°C 摇床培养 12 ~ 16 小时。

[0167] 将过夜培养的 DH5 α 按 1% 比例转种至 LB 培养液中, 37°C 摇床培养至 OD₆₀₀ 为 0.2 ~ 0.4 时, 800g 离心 5 分钟收集细菌。

[0168] 加入 1ml 预冷的 0.1M CaCl₂ 重悬沉淀, 冰水浴 3 小时。4°C 800g 离心 5 分钟, 弃上清。加入 100 μl 预冷的 0.1M CaCl₂ 悬浮沉淀, 冰水浴 1 小时, 备用。

[0169] (2) 含有 X-Gal、IPTG 的 Amp⁺ LB 平板的制备

[0170] LB 固体培养基用前融化, 待温度降至 50°C 左右加入 Amp 至终浓度为 100mg/L, 混匀后倾到平板, 自然凝固。使用前 2 ~ 3 小时取 Amp⁺ LB 平板, 加入 40 μl X-Gal (20mg/ml)、5 μl IPTG (200mg/ml), 用 L 棒涂布均匀, 置于 37°C 孵箱备用。

[0171] (3) 连接产物转化

[0172] 同时分别取三管感受态菌液各 100 μl, 第一管加入连接反应产物, 第二管加入对照插入段 (control insert) DNA 连接产物, 作为阳性对照, 第三管不加外源 DNA, 作为阴性对照, 冰水浴 60 分钟。42°C 水浴热休克 90 秒, 迅速放置冰水浴 1 ~ 2 分钟。每管各加 700 μl LB 培养液, 37°C 摇床培养 1 小时。各管以 800g 离心 1 分钟, 吸弃 400 μl 上清后混匀沉淀, 各取 50 μl 涂布 Amp⁺ LB 平板, 37°C 孵箱培养过夜。

[0173] (4) 目的重组子的筛选与鉴定

[0174] ①挑取连接产物转化平板上分隔良好的蓝、白斑菌落分别接种 Amp⁺ LB 平板, 37°C 培养 12 ~ 16 小时。转种于 Amp⁺ LB 培养液中, 37°C 摇床培养过夜。

[0175] ②质粒 DNA 抽提 (使用 Omega 公司质粒抽提试剂盒) 分别抽提蓝白斑质粒

[0176] 取菌液分装于 1.5ml 离心管中, 12000g 离心 3 分钟, 留取沉淀。

[0177] 每管加 100 μl 溶液 I (Omega 公司质粒抽提试剂盒) 悬浮, 充分振荡混匀。

- [0178] 加入 100 μ l 溶液 II (Omega 公司质粒抽提试剂盒), 轻柔混匀, 冰水浴 5 分钟。
- [0179] 加入 250 μ l 溶液 III (Omega 公司质粒抽提试剂盒), 轻振混匀, 室温放置 10 分钟。
- [0180] 4 $^{\circ}$ C、12000g 离心 10 分钟, 将上清移至分离管中。
- [0181] 12000g 离心 1 分钟, 倾倒收集管中的废液。
- [0182] 加入 500 μ l 洗涤缓冲液 (Omega 公司质粒抽提试剂盒) 于分离管中, 同上离心并弃去收集管中的废液。
- [0183] 重复步骤 7。
- [0184] 12000g 离心 1 分钟, 使乙醇完全挥发。
- [0185] 将分离管置于另一干净 EP 管中并加入一定量的 TE 缓冲液 (Omega 公司质粒抽提试剂盒), 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟, 12000g 离心 1 分钟。
- [0186] 取一定量洗脱液进行电泳, 其余置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。
- [0187] ③酶切鉴定: 分别对蓝斑质粒 DNA 和白斑质粒 DNA 进行双酶切。(限制性内切酶购自大连 TaKaRa 公司)

	蓝斑质粒 DNA	1μl
	BamHI	1μl
	10\times缓冲液(K)	1μl
	ddH₂O	7μl
[0188]	总体积	10μl
	重组质粒 DNA	5μl
	NdeI 或 NcoI	0.5μl
	XhoI	0.5μl
	10\times缓冲液(K)	1μl
[0189]	ddH₂O	3μl
	总体积	10μl

- [0190] 混匀后, 37 $^{\circ}$ C 水浴 4 小时。
- [0191] 5. PCR 产物的序列分析
- [0192] 将 TA 克隆阳性转化菌株送至公司, 按常规方法提取质粒, 采用双脱氧末端终止法, 对插入片段进行序列测定。PCR 扩增效果如附图 2、3、4、7、11 所示。
- [0193] 实施例 2 分子内佐剂融合基因 AhpC-LTB (AL) 的获得
- [0194] 引物设计与合成
- [0195] AhpC P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAAGTTGCC-3'
- [0196] NdeI

[0197] P2' 5' -GCTACCTCCGCCTCCAAGCTTAATGGAAT

[0198] Linker

[0199] LTB P5" 5' -GGAGGCGGAGGTAGCGCTCCCCAGTCTATT-3'

[0200] linker

[0201] P6 5' -CTCGAGGTTTTCCATGCTGATTGC-3'

[0202] XhoI

[0203] 分别以实施例 1 回收的 AhpC 和 LTB 为模板,用 P1 和 P2'、P5" 和 P6 引物分别扩增 AhpC 和 LTB 基因,细菌基因组抽提按天为时代离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行。PCR 扩增体系为:模板 DNA 1 μ l;10 \times PCR 缓冲液 5 μ l;dNTPs (10mmol/L) 4 μ l;引物 (0.025mmol/L) 各 1 μ l;Taq DNA 聚合酶 (5u/ μ l) 0.5 μ l;加去离子水至终体积 50 μ l。

[0204] 将反应体系混匀,离心处理后,加入 30 μ l 石蜡油。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟,94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,60 $^{\circ}$ C 退火 40 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 秒,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 完全延伸 10 分钟。反应完毕后取 1 μ l 反应产物,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 效果。

[0205] 以回收的带有 Linker 的 AhpC 和 LTB 基因为模板,P1 和 P6 为引物进行重叠延伸 PCR 反应。PCR 扩增体系为同前。

[0206] 重叠延伸 PCR 扩增反应:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟,94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,60 $^{\circ}$ C 退火 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 70 秒,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 完全延伸 10 分钟。琼脂糖凝胶电泳后,回收目的片段。

[0207] PCR 产物的克隆及序列分析同前。重叠延伸 PCR 结果见附图 8 所示。

[0208] 实施例 3 分子内佐剂融合基因 AhpC-CTB (AC) 的获得

[0209] 引物设计与合成

[0210] AhpC P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAACCTTGCC-3'

[0211] Nde I

[0212] P2' 5' -GCTACCTCCGCCTCCAAGCTTAATGGAAT

[0213] Linker

[0214] CTB P7" 5' -GGAGGCGGAGGTAGCATTAAATTTAAATTTGGT-3'

[0215] linker

[0216] P8 5' -CTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG-3'

[0217] XhoI

[0218] 分别以实施例 1 回收的 AhpC 和 CTB 为模板,用 P1 和 P2'、P7" 和 P8 为引物,分别扩增 AhpC 和 CTB 基因,细菌基因组抽提按天为时代离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行。PCR 扩增体系为:模板 DNA 1 μ l;10 \times PCR 缓冲液 (含氯化镁) 5 μ l;dNTPs (10mmol/L) 4 μ l;引物 (0.025mmol/L) 各 1 μ l;Taq DNA 聚合酶 (5u/ μ l) 0.5 μ l,加去离子水至终体积 50 μ l。

[0219] 将反应体系混匀,离心处理后,加入 30 μ l 石蜡油。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟,94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,60 $^{\circ}$ C 退火 40 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 秒,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 完全延伸 10 分钟。反应完毕后取 1 μ l 反应产物,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 效果。

[0220] 以回收的带有 Linker 的 AhpC 和 CTB 基因为模板,P1 和 P8 为引物进行重叠延伸 PCR 反应。PCR 扩增体系为同前。

[0221] 重叠延伸 PCR 扩增反应:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟,94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,60 $^{\circ}$ C 退火 30 秒,72 $^{\circ}$ C

延伸 70 秒, 35 个循环, 72°C 完全延伸 10 分钟。琼脂糖凝胶电泳后, 回收目的片段。PCR 产物的克隆及序列分析同前。

[0222] 实施例 4 融合基因 AhpC-NapA (AN) 的获得

[0223] 引物设计与合成

[0224] AhpC P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAACCTTGCC-3'

[0225] NdeI

[0226] P2' 5' -GCTACCTCCGCCTCCAAGCTTAATGGAAT

[0227] Linker

[0228] NapA P3' 5' -TGGAGGCGGAGGTAGCAAAACATTTGAAATT-3'

[0229] linker

[0230] P4 5' -CTCGAGAGCCAAATGGGCTTCTAG-3'

[0231] XhoI

[0232] 以实施例 1 回收的 AhpC 和 NapA 基因为模板, 分别以 P1 和 P2'、P3' 和 P4 为引物进行重叠延伸 PCR 反应。PCR 扩增体系为: 模板 DNA 1 μ l; 10×PCR 缓冲液 5 μ l; dNTPs (10mmol/L) 4 μ l; 引物 (0.025mmol/L) 各 1 μ l; Taq DNA 聚合酶 (5u/μ l) 0.5 μ l, 加去离子水至终体积 50 μ l。

[0233] 将反应体系混匀, 离心处理后, 加入 30 μ l 石蜡油。94°C 预变性 5 分钟, 94°C 变性 30 秒, 60°C 退火 40 秒, 72°C 延伸 40 秒, 35 个循环, 72°C 完全延伸 10 分钟。反应完毕后取 1 μ l 反应产物, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 效果。

[0234] 以回收的带有 Linker 的 AhpC 和 NapA 基因为模板, P1 和 P4 为引物进行重叠延伸 PCR 反应。PCR 扩增体系同前。

[0235] 重叠延伸 PCR 扩增反应: 94°C 预变性 5 分钟, 94°C 变性 30 秒, 60°C 退火 30 秒, 72°C 延伸 70 秒, 35 个循环, 72°C 完全延伸 10 分钟。琼脂糖凝胶电泳后, 回收目的片段。

[0236] PCR 产物的克隆及序列分析同前。

[0237] 实施例 5 分子内佐剂融合基因 AhpC-NapA-LTB (ANL) 的获得

[0238] 引物设计与合成

[0239] AhpC-NapA P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAACCTTGCC-3'

[0240] Nde I

[0241] P4' 5' -GCTACCTCCTCCACTTCCGCCTCCAGCCAAATGGGCTTCTAG-3'

[0242] linker

[0243] LTB P5' 5' -GGAGGCGGAAGTGGAGGAGGTAGCGCTCCCCAGTCTATT-3'

[0244] linker

[0245] P6 5' -CTCGAGGTTTTCCATGCTGATTGC-3'

[0246] XhoI

[0247] 以实施例 4 回收的 AhpC-NapA 基因和实施例 1 回收的 LTB 基因组为模板, 以 P1 和 P4'、P5' 和 P6 为引物扩增 AhpC-NapA 和 LTB 基因。PCR 扩增体系为: 模板 DNA 1 μ l; 10×PCR 缓冲液 5 μ l; dNTPs (10mmol/L) 4 μ l; 引物 (0.025mmol/L) 各 1 μ l; Taq DNA 聚合酶 (5u/μ l) 0.5 μ l, 加去离子水至终体积 50 μ l。

[0248] 将反应体系混匀, 离心处理后, 加入 30 μ l 石蜡油。94°C 预变性 5 分钟, 94°C 变性

30 秒,60°C退火 40 秒,72°C延伸 70 秒,35 个循环,72°C完全延伸 10 分钟。反应完毕后取 1 μl 反应产物,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 效果。

[0249] 以回收的带有接头的 AhpC-NapA 融合基因和 LTB 为模板,P1 和 P6 为引物进行重叠延伸 PCR 反应。PCR 扩增体系同前。

[0250] 重叠延伸 PCR 扩增反应:94°C预变性 5 分钟,94°C变性 30 秒,60°C退火 30 秒,72°C延伸 90 秒,35 个循环,72°C完全延伸 10 分钟。琼脂糖凝胶电泳后,回收目的片段。

[0251] PCR 产物的克隆及序列分析同前。重叠延伸结果见附图 9、10 所示。

[0252] 实施例 6 分子内佐剂融合基因 AhpC-NapA-CTB (ANC) 的获得

[0253] 引物设计与合成

[0254] AhpC-NapA P1 5' -CGCATATGTTAGTTACAAAACCTGCC-3'

[0255] Nde I

[0256] P4' 5' -GCTACCTCCTCCACTTCCGCCTCCAGCCAAATGGGCTTCTAG-3'

[0257] linker

[0258] CTB P7' 5' -GGAGGCGGAAGTGGAGGAGGTAGCATTAATAATTAATTTGGT-3'

[0259] linker

[0260] P8 5' -CTCGAGATTTGCCATACTAATTGCG-3'

[0261] XhoI

[0262] 以实施例 4 回收的 AhpC-NapA 基因和实施例 1 回收的 CTB 基因组为模板,以 P1 和 P4'、P7' 和 P8 为引物扩增 AhpC-NapA 和 CTB 基因。PCR 扩增体系为:

[0263] 模板 DNA 1 μl;10×PCR 缓冲液 5 μl;dNTPs (10mmol/L) 4 μl;引物 (0.025mmol/L) 各 1 μl;Taq DNA 聚合酶 (5u/μl) 0.5 μl,加去离子水至终体积 50 μl。

[0264] 将反应体系混匀,离心处理后,加入 30 μl 石蜡油。94°C预变性 5 分钟,94°C变性 30 秒,60°C退火 40 秒,72°C延伸 70 秒,35 个循环,72°C完全延伸 10 分钟。反应完毕后取 1 μl 反应产物,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 效果。

[0265] 以回收的带有 Linker 的 AhpC-NapA 融合基因和 CTB 为模板,P1 和 P8 为引物进行重叠延伸 PCR 反应。PCR 扩增体系同前。

[0266] 重叠延伸 PCR 扩增反应:94°C预变性 5 分钟,94°C变性 30 秒,60°C退火 30 秒,72°C延伸 90 秒,35 个循环,72°C完全延伸 10 分钟。琼脂糖凝胶电泳后,回收目的片段。

[0267] PCR 产物的克隆及序列分析同前。

[0268] 实施例 7 重组基因表达质粒及高效表达工程菌的构建及筛选

[0269] 1. 重组质粒的构建

[0270] 将含目的基因的 pMD-18T 载体及表达载体 pET-28a(+) 或 pET-22b(+) (购自美国 Novagen 公司,本室保存) 双酶切,酶切产物经 1.0%琼脂糖电泳、目的片段胶回收纯化后,用连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 α,提取质粒,双酶切,1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

[0271] 有关操作具体步骤如下:

[0272] 1) 质粒 DNA 抽提 (使用 Omega 公司质粒抽提试剂盒,按试剂盒使用说明书操作)

[0273] (1) 挑取平板上分隔良好的菌落转种于带相应抗生素的 LB 培养液中,37°C摇床培养过夜;

[0274] (2) 取菌液分装于 1.5mL 离心管中,12000g 离心 3 分钟,留取沉淀;

- [0275] (3) 每管加 100 μ L 溶液 I (Omega 公司质粒抽提试剂盒) 悬浮, 充分振荡混匀;
- [0276] (4) 加入 100 μ L 溶液 II (Omega 公司质粒抽提试剂盒), 轻柔混匀, 冰水浴 5 分钟;
- [0277] (5) 加入 250 μ L 溶液 III (Omega 公司质粒抽提试剂盒), 轻振混匀, 室温放置 10 分钟;
- [0278] (6) 4 $^{\circ}$ C、12000g 离心 10 分钟, 将上清移至分离管中;
- [0279] (7) 12000g 离心 1 分钟, 倾倒收集管中的废液;
- [0280] (8) 加入 500 μ L 洗涤缓冲液 (Omega 公司质粒抽提试剂盒) 于分离管中, 同上离心并弃去收集管中的废液, 重复洗涤一次;
- [0281] (9) 12000g 离心 1 分钟, 使乙醇完全挥发;
- [0282] (10) 将分离管置于另一干净 EP 管中并加入一定量的 TE 缓冲液 (Omega 公司质粒抽提试剂盒), 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟, 12000g 离心 1 分钟;
- [0283] (11) 取一定量洗脱液进行电泳, 其余置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。
- [0284] 2) 琼脂糖凝胶电泳:
- [0285] 1. 0% 琼脂糖凝胶, 1 \times TAE 缓冲液, 120-150mA, 电泳 20-40 分钟。
- [0286] 50 \times TAE 储存液配方: 2.0mol/L Tris 碱, 1.0mol/L NaAc, 0.1mol/L Na₂EDTA; 用冰醋酸调节 pH8.3。
- [0287] 3) 质粒 DNA 的酶切反应:
- [0288] 1 μ g 质粒 DNA
- [0289] 1 μ l 10 \times 缓冲液 (TaKaRa 内切酶试剂)
- [0290] 1 μ l 限制性内切酶 Nco I/XhoI 或 NdeI/XhoI (10u/ μ l)
- [0291] 用双蒸水补至 10 μ l
- [0292] 混合后 37 $^{\circ}$ C 温育 1-2 小时。
- [0293] 4) 琼脂糖电泳胶的目的 DNA 回收纯化:
- [0294] 在紫外灯下观察并切下琼脂糖凝胶上的目的 DNA 电泳带, 移入 1.5mL EP 管。
- [0295] 加入 Omega 公司胶回收试剂盒的 DNA 结合缓冲液, 65 $^{\circ}$ C 水浴使凝胶完全溶化并保持溶液 pH 在 5.0 ~ 6.0 之间。将溶胶液移入分离管, 12000g 离心 1 分钟, 弃去收集管中的液体。
- [0296] 加入配套的洗涤缓冲液 (Omega 公司质粒抽提试剂盒), 12000g 离心 1 分钟, 弃去收集管中的液体。重复洗涤 1 次。
- [0297] 12000g 离心 1 分钟, 分离管移置另一干净 1.5mL EP 管, 加入一定体积的 TE 缓冲液, 65 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟, 12000g 离心 1 分钟, 取一定量电泳, UVP 紫外扫描仪检测回收纯化效果。
- [0298] 5) 连接反应 (使用上海生工公司连接试剂盒)
- [0299] 通过紫外分光光度计检测目的 DNA 片段和载体片段的浓度, 根据外源片段与载体摩尔数比一般为 1 : 2 ~ 10 的原则, 设计连接反应体系如下:
- [0300] 目的 DNA 1 μ l; 质粒载体 1 ~ 2 μ l; 连接溶液 5 μ l; ddH₂O 2 ~ 3 μ l, 总体积 10 μ l。22 $^{\circ}$ C 连接 12-16 小时。
- [0301] 6) 感受态菌的制备 (CaCl₂ 法)
- [0302] (1) 无菌接种环蘸取 -70 $^{\circ}$ C 冻存的细菌保种液, 三线法划线接种于 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培

养 12 ~ 16h。

[0303] (2) 挑取单个菌落接种于 2mL LB 培养液中, 37°C 摇床培养 12 ~ 16h。

[0304] (3) 将过夜培养的 DH5a 按 1% 比例转种至 LB 培养液中, 37°C 摇床培养至 OD_{600} 至 0.2 ~ 0.4 时, 8000g 离心 5 分钟收集细菌。

[0305] (4) 加入 1ml 预冷的 0.1mol/L $CaCl_2$ 重悬沉淀, 冰水浴 3 小时。4°C 8000g 离心 5 分钟, 弃上清。加入 100 μ l 预冷的 0.1mol/L $CaCl_2$ 悬浮沉淀, 冰水浴 1 小时, 备用。

[0306] 7) 连接产物转化

[0307] (1) 取感受态菌液 100 μ l, 加入连接反应产物; 冰水浴 60 分钟, 42°C 水浴热休克 100s, 迅速放置冰水浴 1 ~ 2 分钟。

[0308] (2) 加 100 μ l LB 培养液, 37°C 摇床培养 1 小时。

[0309] (3) 以 8000g 离心 10 分钟, 吸弃 100 μ l 上清后混匀沉淀, 各取 50 μ l 涂布平板, 37°C 孵箱培养过夜。

[0310] 2. 高效表达融合蛋白工程菌的构建及筛选

[0311] 将含目的融合基因的重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态菌中, 经 Amp^+ 或 K^+ LB 平板筛选, 提取质粒酶切鉴定。

[0312] 取经鉴定的重组菌接种于 3ml 含 Kan 或 Amp 的 LB 培养液中, 37°C 摇床培养过夜。次日将过夜培养的重组工程菌按 1% 的比例转种于 20ml 含 Kan 或 Amp 的 LB 培养液中, 37°C 摇床培养 2.5 小时, 以 IPTG 诱导 5 小时, SDS-PAGE 检测融合蛋白的表达形式和表达量, 筛选高效表达菌株。

[0313] 构建及诱导表达结果见附图 4、5、12、13 所示。

[0314] 实施例 8 基因重组表达工程菌的发酵

[0315] 发酵工艺如下:

[0316] 采用德国 B. Braun 10L 发酵罐, 发酵过程中种子菌 10% 比例接种, 保持 45% 溶氧、温度 37°C、pH7.4, 待葡萄糖浓度降为 0.1% 时加入 IPTG 500 μ mol/L 诱导 4 ~ 6 小时收菌。

[0317] 发酵过程在级联溶氧控制的分批培养基基础上, 流加补料。

[0318] 发酵过程所用培养基为改良 M9-CAA 培养基, 在 M9-CAA 的基础上添加 0.6% 酵母浸出液和 2mg/L $ZnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、2mg/L $CoCl_2 \cdot 4H_2O$ 、4mg/L $FeSO_4 \cdot 16H_2O$ 、5mg/L H_3BO_3 、1.6mg/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、4mg/L $CuSO_4$ 而成。

[0319] 发酵后回收菌液, 4°C 离心 (8000g) 15 分钟。吸弃上清, 收集细菌, 称重后冻存备用。

[0320] 结果: 10L 发酵菌液可以收获细菌湿重 600 克左右。

[0321] 实施例 9 重组目的蛋白的纯化及剂型制备

[0322] 1. 可溶性上清和包涵体提取: 将高效表达的菌体 200-500g 以 TE 缓冲液 (20mmol/L Tris, 5mmol/L EDTA, pH 8.0) 1:10 (W/V) 比例悬浮, 4°C 预冷后采用细胞匀浆机使其混合均匀。采用高压均质机在压力为 70Mpa 的条件下进行破菌 (共破菌 4 ~ 6 次), 破菌完毕后, 取少量菌液涂片染色, 显微镜下观察细胞的完整性, 确保细胞破碎完全, 随后以 500 \times g 离心 30 分钟, 弃沉淀, 再以 15,000 \times g 离心 40 分钟, 收集沉淀即为包涵体。包涵体以 1:10 (W/V) 的比例分别用洗涤液 A (20mmol/L Tris, 5mmol/L EDTA, pH 8.0) 和洗涤液 B (20mmol/L Tris, 2mol/L 尿素, pH 8.0) 各洗涤 2 次。洗涤条件为: 4°C 搅拌 20 分钟, 15,000 \times g 离心

40 分钟,收集包涵体沉淀;最后将包涵体用包涵体溶解液(1mmol/L EDTA、20mmol/L Tris、8mol/L 尿素 pH 8.0)以 1 : 10(W/V)的比例混合,4℃搅拌 3 小时,15,000×g 离心 45 分钟,取上清作为下一步纯化的原料。

[0323] 包涵体提取所用缓冲液:

[0324] 1) TE 缓冲液:20mmol/L Tris,5mmol/L EDTA,pH 8.0

[0325] 2) 包涵体洗涤液 A:5mmol/L EDTA、20mmol/L Tris、1% Triton X-100,pH 8.0

[0326] 3) 包涵体洗涤液 B:20mmol/L Tris、2mol/L 尿素,pH 8.0

[0327] 4) 包涵体溶解液:1mmol/L EDTA、20mmol/L Tris、8mol/L 尿素(pH 8.0)

[0328] 2. 金属离子螯合层析:选择亲和层析柱 Chelating Sepharose 进行纯化,使用 20mmol/L Tris,5mmol/L EDTA,pH7.0 ~ 9.0 对目的蛋白进行纯化,采用咪唑梯度洗脱。

[0329] 3. 阴离子柱纯化:选择阴离子柱 HiTrap Q 进行纯化,使用 20mmol/L Tris,5mmol/L EDTA,pH7.0 ~ 9.0 对目的蛋白进行纯化,采用 NaCl 梯度洗脱。

[0330] 4. Superdex 凝胶过滤层析脱盐:步骤 3 所获目标蛋白经葡聚糖 PEG 透析袋内浓缩或超滤浓缩后用凝胶过滤柱 Superdex 过滤脱盐,脱尿素及咪唑。

[0331] 5. 纯化后的目的蛋白进行 SDS-PAGE,检定其纯度。Lowry 法检测蛋白浓度。

[0332] 其中,步骤 2 所述镍离子亲和纯化填料包括 Chelating Sepharose HP、Chelating SepharoseFF;

[0333] 步骤 3 所述阴离子纯化填料包括 Q Sepharose HP、Q Sepharose FF、Q Sepharose XL;

[0334] 步骤 4 所述凝胶过滤层析柱包括 Superdex 75、Superdex 200、Superdex HR 10/30。

[0335] 纯化结果如附图 3 所示。

[0336] 6. 上述方法获得的重组蛋白分别被制备成冷冻干燥剂型或胶囊剂。其中冷冻干燥剂型加纯化水或注射用水溶解后供口服。冷冻干燥剂型制备方法为:向纯化所获得的目的蛋白中加入适当比例(5%~20%)的稳定剂甘露醇(果糖或山梨醇),混匀,除菌过滤分装后冷冻干燥;胶囊剂型制备方法为:首先向纯化所获得的目的蛋白中加入适当比例(5%~20%)的稳定剂甘露醇,混匀,除菌过滤分装后冷冻干燥,再装填入肠溶胶囊。

[0337] 目的蛋白表达形式鉴定见附图 6、14 所示

[0338] 实施例 10 加有分子外佐剂(LTB、CTB)的幽门螺杆菌 AhpC 基因工程疫苗的制备

[0339] 1. 以 LTB 为佐剂的幽门螺杆菌 AhpC 基因工程疫苗的制备:纯化的 Hp 重组抗原蛋白(rAhpC 或 rAhpC-NapA)以不同组合形式与粘膜佐剂 rLTB 物理混合,制备出幽门螺杆菌 AhpC 基因工程疫苗。该疫苗以 rLTB 作为粘膜佐剂,适用于粘膜途径(胃肠道、鼻粘膜等)的免疫接种。

[0340] 2. 以 CTB 为佐剂的幽门螺杆菌 AhpC 基因工程疫苗的制备:纯化的 Hp 重组抗原蛋白(rAhpC 或 rAhpC-NapA)以不同组合形式与粘膜佐剂 CTB 物理混合,制备出幽门螺杆菌 AhpC 基因工程疫苗。该疫苗以 CTB 作为粘膜佐剂,适用于粘膜途径(胃肠道、鼻粘膜等)的免疫接种。

[0341] 3. 剂型制备同实施例 9。

[0342] 实施例 11 加有分子内佐剂(LTB、CTB)的幽门螺杆菌 AhpC 基因工程疫苗的制备

[0343] 1. 以 LTB 为佐剂的幽门螺杆菌 AhpC 基因工程疫苗的制备:纯化的 Hp 重组抗原蛋白 rAhpC-NapA-LTB 作为幽门螺杆菌 AhpC 基因工程疫苗。该疫苗适用于粘膜途径(胃肠道、鼻粘膜等)的免疫接种。

[0344] 2. 以 CTB 为佐剂的幽门螺杆菌 AhpC 基因工程疫苗的制备:纯化的 Hp 重组抗原蛋白 rAhpC-NapA-CTB 作为幽门螺杆菌 AhpC 基因工程疫苗。该疫苗适用于粘膜途径(胃肠道、鼻粘膜等)的免疫接种。

[0345] 3. 剂型制备同实施例 9。

[0346] 目的蛋白纯化结果见附图 15 所示

[0347] 实施例 12 生物学活性实验

[0348] 1、BALB/c 小鼠免疫后特异性免疫应答

[0349] 将不同剂型基因工程疫苗口服免疫 BALB/c 小鼠,150 μ g/只,分别于第 0,1,2,4 周各免疫一次,于末次免疫后 1 周采集血液、胃肠道冲洗液和粪便抽提物,ELISA 检测血清中特异性抗体 IgG、IgA 及胃肠道冲洗液和粪便抽提物中特异性抗体 sIgA 水平。同时,设立对照组。

[0350] 结果免疫 4 次后不同组合的幽门螺杆菌 AhpC 基因工程疫苗试验组小鼠特异性抗体 IgG、IgA 和 sIgA 水平与 PBS 对照组相比较相差极显著 ($P < 0.001$),提示不同疫苗口服免疫后激发小鼠产生粘膜局部免疫应答和系统性免疫应答。同时从不同的免疫指标的检测结果认为口服后激发小鼠的以 Th1、Th2 平衡的特异性的免疫应答。

[0351] 2、蒙古沙鼠口服免疫攻毒保护实验

[0352] 将不同剂型基因工程疫苗免疫蒙古沙鼠,分别于第 0、1、2、4 周各免疫一次,末次免疫后 10 天,以幽门螺杆菌适应株 M13 攻毒,攻毒后 30 天剖杀动物,取胃组织进行细菌培养、PCR 检查和病理切片检查。结果对照组感染率为 100%,各组免疫保护效果如表 1 所示:

[0353] 表 1 口服免疫蒙古沙鼠后攻毒免疫保护效果

[0354]

序号	组别	攻毒后存活数(只)	阴性(只)	阳性(只)	保护率(%)
1	对照组	30	0	30	-
2	rAhpC	30	4	26	13.3
3	rLTB	29	0	29	-
4	rCTB	27	0	27	-
5	rAhpC+rLTB	29	10	19	34.5

[0355]

6	rAhpC+rCTB	28	7	21	25.0
7	rAhpC-LTB	30	11	19	36.7
8	rAhpC-CTB	29	8	21	27.6
9	rAhpC+rNapA	30	14	16	46.7
10	rAhpC-NapA	30	15	15	50.0
11	rAhpC+rNapA+rLTB	29	21	8	72.4*
12	rAhpC+rNapA+rCTB	29	19	10	65.6*
13	rAhpC-NapA-LTB	30	25	5	83.3*
14	rAhpC-NapA-CTB	30	23	7	76.7*

[0356] 结果显示, rAhpC 单亚单位免疫组仅获得 13.3% 的免疫保护率, 而 AhpC 和 NapA 物理混合或融合免疫组的免疫保护率提高到 46.7% 和 50.0%。证明一种抗原免疫很难在人体诱导出足够的保护性免疫, 多种抗原组合似乎能引起更有效地保护性免疫。

[0357] rAhpC 与粘膜佐剂 LTB 或 CTB 混合或融合后, 免疫保护率与单亚单位免疫组相比, 保护率提高到 34.5%、25.0% 和 36.7%、27.6%, AhpC 和 NapA 与粘膜佐剂 LTB 或 CTB 物理混合或融合免疫组的免疫保护率提高到 72.4%、65.6% 和 83.3%、76.7%, 以上结果证明 LTB 和 CTB 具有良好的免疫原性和强效佐剂效应, 可加强对免疫原的免疫应答能力。但是 CTB 激活 Th2 可产生 IL-4, IL-4 则能选择性地促进 IgE 合成, 因而认为 CTB 有可能引起变态反应, 而 LTB 基本上不诱生 IgE, 却能有效地启动机体局部和全身的体液和细胞免疫。在实验中, 粘膜佐剂 LTB 或 CTB 在物理混合组和融合组之间比较, LTB 免疫组的保护率高于 CTB 免疫组, 且融合组保护率高于物理混合组。同样抗原不同组合方式之间差异经统计分析, 相差不显著, 多抗原组较单一或双亚单位组的免疫保护率高, 且相差显著。

[0358] 结论: 融合疫苗抗原 AUL 免疫蒙古沙鼠较其他各组可产生针对 Hp 全菌攻击有效的保护作用, 同时融合方式的疫苗具有简便、便于操作等优点, 避免了多个亚单位分别纯化的缺点, 使纯化工艺更加简便易行。同时, 融合后的蛋白更好的发挥其免疫保护效果, 较单亚单位和多亚单位物理混合组产生更好的免疫保护效果。

[0359] 序列表

[0360] <110> 中国人民解放军第三军医大学

[0361] <120> 一种人幽门螺杆菌感染预防和治疗用 AhpC 多价亚单位疫苗及其制备方法

[0362] <160>594

[0363] <210>1

[0364] <211>594

[0365] <212>DNA

[0366] <213>E. coli BL21 (DE3) ahpC

[0367] <220>

[0368] <221>gene

[0369] <222>(1)... (594)

[0370] <400>

[0371] ATGTTAGTTACAAAACCTTGCCCCGATTTTAAAGCACCTGCCGTTTTAGG 50

[0372] AAACAATGAGGTTGATGAACACTTTGAGCTTTCTAAAAATTTAGGCAAAA 100
 [0373] ATGGTGCGATTCTTTTCTTTTGGCCAAAAGATTTTACTTTTGTATGCCCT 150
 [0374] ACAGAAATCATTGCGTTTGACAAAAGAGTGAAAAGACTTTCACGAAAAAAGG 200
 [0375] CTTTAATGTGATTGGCGTGTCTATTGACAGCGAGCAAGTGCATTTTCGCAT 250
 [0376] GGAAAAACACCCCTGTGGAAAAAGGCGGTATCGGTCAAGTGTCTTTCCCT 300
 [0377] ATGGTGGCTGATATACTAAGAGCATTTCCAGAGATTATGATGTGCTGTT 350
 [0378] TGAAGAAGCGATCGCTTTGAGAGGCTCTTTTTTGATTGACAAAAACATGA 400
 [0379] AAGTAAGACACGCAGTGGTCAATGATTTGCCATTAGGTAGGAATGCAGAC 450
 [0380] GAGATGCTTCGCATGGTAGACGCTCTTACACTTTGAAGAACATGGTGA 500
 [0381] AGTGTGCCCAGCAGGCTGGAGAAAAGGCGATAAAAGGCATGAAAAGCGACTC 550
 [0382] ACCAAGGCGTTGCAGAGTATCTCAAAGAAAATTCATTAAGCTT 594
 [0383] <160>198
 [0384] <210>1
 [0385] <211>198
 [0386] <212>PRT
 [0387] <213>E. coli BL21 (DE3) AhpC
 [0388] <220>
 [0389] <221>CDS
 [0390] <222>(1)... (198)
 [0391] <400>
 [0392] MLVTKLAPDFKAPAVLGNNEVDEHFELSKNLGKNGAILFFWPKDFTFVCP 50
 [0393] TEIIAFDKRVKDFHEKGFNVIGVSIIDSEQVHFKNTPVEKGGIGQVSFPP 100
 [0394] MVADITKKSISRDYDVFEEAIALRGSFLIDKNMKVRHAVVNDLPLGRNAD 150
 [0395] EMLRMVDALLHFEEHHGEVCPAGWRKGDGKMKATHQGVAEYLKENS IKL. 198
 [0396] <160>918
 [0397] <210>1
 [0398] <211>918
 [0399] <212>DNA
 [0400] <213>E. coli BL21 (DE3) ahpC-1tB
 [0401] <220>
 [0402] <221>gene
 [0403] <222>(1)... (918)
 [0404] <400>
 [0405] ATGTTAGTTACAAAACCTTGCCCCGATTTTAAAGCACCTGCCGTTTTAGG 50
 [0406] AAACAATGAGGTTGATGAACACTTTGAGCTTTCTAAAAATTTAGGCAAAA 100
 [0407] ATGGTGCGATTCTTTTCTTTTGGCCAAAAGATTTTACTTTTGTATGCCCT 150
 [0408] ACAGAAATCATTGCGTTTGACAAAAGAGTGAAAAGACTTTCACGAAAAAAGG 200
 [0409] CTTTAATGTGATTGGCGTGTCTATTGACAGCGAGCAAGTGCATTTTCGCAT 250
 [0410] GGAAAAACACCCCTGTGGAAAAAGGCGGTATCGGTCAAGTGTCTTTCCCT 300

[0411] ATGGTGGCTGATATTACTAAGAGCATTTCCAGAGATTATGATGTGCTGTT 350
[0412] TGAAGAAGCGATCGCTTTGAGAGGCTCTTTTTTGATTGACAAAAACATGA 400
[0413] AAGTAAGACACGCAGTGGTCAATGATTTGCCATTAGGTAGGAATGCAGAC 450
[0414] GAGATGCTTCGCATGGTAGACGCTCTTACTTTGAAGAACATGGTGA 500
[0415] AGTGTGCCCAGCAGGCTGGAGAAAAGGCGATAAAGGCATGAAAAGCGACTC 550
[0416] ACCAAGGCGTTGCAGAGTATCTCAAAGAAAATTCCATTAAGCTTGGAGGC 600
[0417] GGAGGTAGCGCTCCCCAGTCTATTACAGAACTATGTTTCGGAATATCGCAA 650
[0418] CACACAAATATATACGATAAAATGACAAGATACTATCATATACGGAATCGA 700
[0419] TGGCAGGTAAAAGAGAAAATGGTTATCATTACATTTAAGAGCGGCGCAACA 750
[0420] TTTTCAGGTCAAGTCCCGGGCAGTCAACATATAGACTCCCAAAAAAAGC 800
[0421] CATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATATCTGACCGAGACCA 850
[0422] AAATTGATAAATTATGTGTATGGAATAATAAAACCCCAATTCAATTGCG 900
[0423] GCAATCAGTATGGAAAAC 918
[0424] <160>978
[0425] <210>1
[0426] <211>978
[0427] <212>DNA
[0428] <213>E. coli BL21 (DE3) ahpC-ctB
[0429] <220>
[0430] <221>gene
[0431] <222>(1)... (978)
[0432] <400>
[0433] ATGTTAGTTACAAAACCTTGCCCCGATTTTAAAGCACCTGCCGTTTTAGG 50
[0434] AAACAATGAGGTTGATGAACACTTTGAGCTTTCTAAAAATTTAGGCAAAA 100
[0435] ATGGTGCATTCTTTTCTTTTGGCCAAAAGATTTTACTTTTGTATGCCCT 150
[0436] ACAGAAATCATTGCGTTTGACAAAAGAGTGAAAAGACTTTCACGAAAAAGG 200
[0437] CTTTAATGTGATTGGCGTGTCTATTGACAGCGAGCAAGTGCATTTTCGCAT 250
[0438] GGAAAAACACCCCTGTGGAAAAAGGCGGTATCGGTCAAGTGTCTTTCCCT 300
[0439] ATGGTGGCTGATATTACTAAGAGCATTTCCAGAGATTATGATGTGCTGTT 350
[0440] TGAAGAAGCGATCGCTTTGAGAGGCTCTTTTTTGATTGACAAAAACATGA 400
[0441] AAGTAAGACACGCAGTGGTCAATGATTTGCCATTAGGTAGGAATGCAGAC 450
[0442] GAGATGCTTCGCATGGTAGACGCTCTTACTTTGAAGAACATGGTGA 500
[0443] AGTGTGCCCAGCAGGCTGGAGAAAAGGCGATAAAGGCATGAAAAGCGACTC 550
[0444] ACCAAGGCGTTGCAGAGTATCTCAAAGAAAATTCCATTAAGCTTGGAGGC 600
[0445] GGAGGTAGCATTAATTAATAATTTGGTGTTTTTTTTACAGTTTTACTATC 650
[0446] TTCAGCATATGCACATGGAACACCTCAAAAATTTACTGATTTGTGTGCAG 700
[0447] AATACCACAACACACAAAATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTAT 7500
[0448] ACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAA 800
[0449] TGGTGCAACTTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTCAC 850

[0450] AAAAAAAGCGATTGAAAGGATGAAGGATACCCCTGAGGATTGCATATCTT 900
[0451] ACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAAACGCCTCA 950
[0452] TGCGATTGCCGCAATTAGTATGGCAAAT 978
[0453] <160>1371
[0454] <210>1
[0455] <211>1371
[0456] <212>DNA
[0457] <213>E. coli BL21 (DE3) ahpC-napA-1 tB
[0458] <220>
[0459] <221>gene
[0460] <222>(1)... (1371)
[0461] <400>
[0462] ATGTTAGTTACAAAACCTTGCCCCAGATTTTAAAGCACCTGCCGTTTTAGG 50
[0463] AAACAATGAGGTTGATGAACACTTTGAGCTTTCTAAAAATTTAGGCAAAA 100
[0464] ATGGTGCATTCTTTTCTTTTGGCCAAAAGATTTTACTTTTGTATGCCCT 150
[0465] ACAGAAATCATTGCGTTTGACAAAAGAGTGAAAAGACTTTCACGAAAAAGG 200
[0466] CTTTAATGTGATTGGCGTGTCTATTGACAGCGAGCAAGTGCATTTTCGCAT 250
[0467] GGAAAAACACCCCTGTGGAAAAAGGCGGTATCGGTCAAGTGTCTTTCCCT 300
[0468] ATGGTGGCTGATATTACTAAGAGCATTCTAGAGATTATGATGTGCTGTT 350
[0469] TGAAGAAGCGATCGCTTTGAGAGGCTCTTTTTTGATTGACAAAAACATGA 400
[0470] AAGTAAGACACGCAGTGGTCAATGATTTGCCATTAGGTAGGAATGCAGAC 450
[0471] GAGATGCTTCGCATGGTAGACGCTCTTACACTTTGAAGAACATGGTGA 500
[0472] AGTGTGCCCAGCAGGCTGGAGAAAAGGCGATAAAGGCATGAAAAGCGACTC 550
[0473] ACCAAGGCGTTGCAGAGTATCTTAAAGAAAATTCATTAAAGCTTGGAGGC 600
[0474] GGAGGTAGCAAAACATTTGAAATTTTAAACATTTGCAAGCGGATGCGAT 650
[0475] CGTGTATTATGAAAGTGCATAACTTCCATTGGAATGTGAAAAGGCACCG 700
[0476] ATTTTTTCCATGTGCATAAAGCCACTGAAGAAAATTTATGAAGAATTTGCG 750
[0477] GACATGTTTGTATGATCTCGCTGAAAGGATTGTTCAATTAGGACACCACC 800
[0478] ATTAGTCACTTTATCCGAAGCGCTCAAACACTCGCGTCAAAGAAGAAA 850
[0479] CTAAAAACAAGCTTCCACTCTAAAGACATCTTAAAGAAAATCTAGGCGAT 900
[0480] TACAAACACCTAGAAAAAGAATTTAAAGAGCTCTCTAACACCGCTGAAAA 950
[0481] AGAAGGCGATAAAGTAACCGTAACTTATGCGGACGATCAATTAGCCAAGT 1000
[0482] TGCAAAAATCCATTTGGATGCTAGAAGCCATTTGGCTGGAGGCGGAAGT 1050
[0483] GGAGGAGGTAGTGCACCCCAGTCTATTACAGAACTATGTTCCGGAATATCG 1100
[0484] CAACACACAAAATATATACGATAAATGACAAGATACTATCATATACGGAAT 1150
[0485] CGATGGCAGGTAAAAGAGAAAATGGTTATCATTACATTTAAGAGCGGCGCA 1200
[0486] ACATTTCAAGGTCGAAGTCCCGGGCAGTCAACATATAGACTCCCAAAAAA 1250
[0487] AGCCATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATATCTGACCGAGA 1300
[0488] CCAAAAATTGATAAATTTATGTGTATGGAATAATAAAACCCCAATTCAATT 1350

[0489] GCGGCAATCAGTATGGAAAAC 1371
[0490] <160>1431
[0491] <210>1
[0492] <211>1431
[0493] <212>DNA
[0494] <213>E. coli BL21 (DE3) ahpC-napA-ctB
[0495] <220>
[0496] <221>gene
[0497] <222>(1)... (1431)
[0498] <400>
[0499] ATGTTAGTTACAAAACCTTGCCCCAGATTTTAAAGCACCTGCCGTTTTAGG 50
[0500] AAACAATGAGGTTGATGAACACTTTGAGCTTTCTAAAAATTTAGGCAAAA 100
[0501] ATGGTGCATTCTTTTCTTTTGGCCAAAAGATTTTACTTTTGTATGCCCT 150
[0502] ACAGAAATCATTGCGTTTGACAAAAGAGTGAAAAGACTTTCACGAAAAAGG 200
[0503] CTTTAATGTGATTGGCGTGTCTATTGACAGCGAGCAAGTGCATTTTCGCAT 250
[0504] GGAAAAACACCCCTGTGGAAAAAGGCGGTATCGGTCAAGTGTCTTTCCCT 300
[0505] ATGGTGGCTGATATTACTAAGAGCATTCTAGAGATTATGATGTGCTGTT 350
[0506] TGAAGAAGCGATCGCTTTGAGAGGCTCTTTTTTGATTGACAAAAACATGA 400
[0507] AAGTAAGACACGCAGTGGTCAATGATTTGCCATTAGGTAGGAATGCAGAC 450
[0508] GAGATGCTTCGCATGGTAGACGCTCTTACACTTTGAAGAACATGGTGA 500
[0509] AGTGTGCCCAGCAGGCTGGAGAAAAGGCGATAAAGGCATGAAAAGCGACTC 550
[0510] ACCAAGGCGTTGCAGAGTATCTTAAAGAAAAATCCATTAAGCTTGGAGGC 600
[0511] GGAGGTAGCAAAAACATTTGAAATTTTAAAAACATTTGCAAGCGGATGCGAT 650
[0512] CGTGTTATTTATGAAAGTGCATAACTTCCATTGGAATGTGAAAAGGCACCG 700
[0513] ATTTTTTCCATGTGCATAAAGCCACTGAAGAAATTTATGAAGAATTTGCG 750
[0514] GACATGTTTGTATGATCTCGCTGAAAGGATTGTTCAATTAGGACACCACCC 800
[0515] ATTAGTCACTTTATCCGAAGCGCTCAAACACTCGCGTCAAAGAAGAAA 850
[0516] CTAAAAACAAGCTTCCACTCTAAAGACATCTTAAAGAAATTTCTAGGCGAT 900
[0517] TACAAACACCTAGAAAAAGAATTTAAAGAGCTCTCTAACACCGCTGAAAA 950
[0518] AGAAGGCGATAAAGTAACCGTAACTTATGCGGACGATCAATTAGCCAAGT 1000
[0519] TGCAAAAATCCATTTGGATGCTAGAAGCCCATTTGGCTGGAGGCGGAAGT 1050
[0520] GGAGGAGGTAGTATTAATTAATAATTTGGTGTTTTTTTTTACAGTTTTACT 1100
[0521] ATCTTCAGCATATGCACATGGAACACCTCAAAAATTTACTGATTTGTGTG 1150
[0522] CAGAATACCACAACACACAAAATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCG 1200
[0523] TATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAA 1250
[0524] GAATGGTGCAACTTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATT 1300
[0525] CACAAAAAAAAGCGATTGAAAAGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATAT 1350
[0526] CTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAAAACGCC 1400
[0527] TCATGCGTGCCGCAATTAGTATGGCAAAT 1431

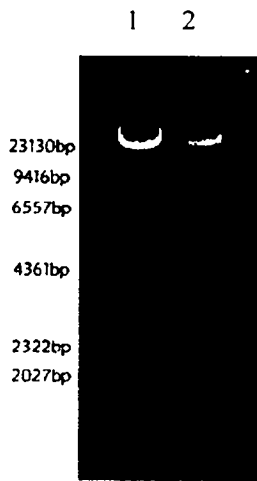


图 1 Hp 基因组
抽提琼脂糖
电泳结果

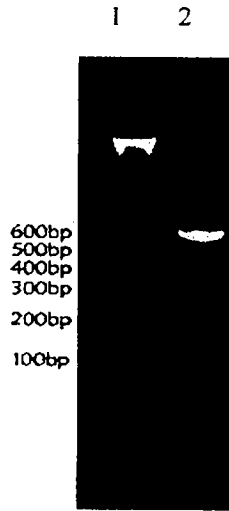


图 2 ahpC 基因
PCR 扩增结果

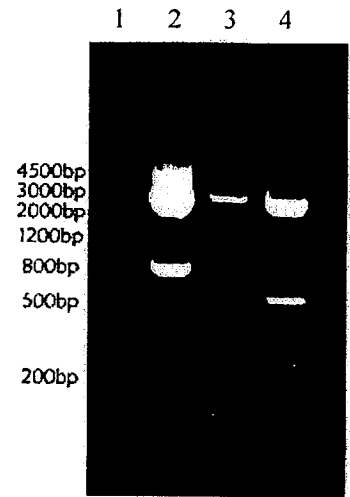


图 3 克隆载体
pMD-18-ahpC
酶切鉴定结果

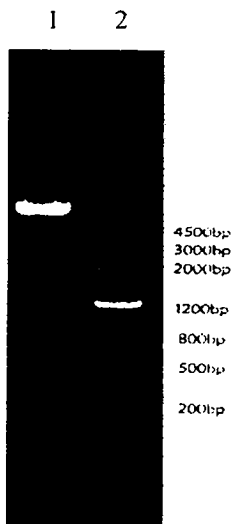


图 4 表达载体
pET22b-ahpC
酶切鉴定结果

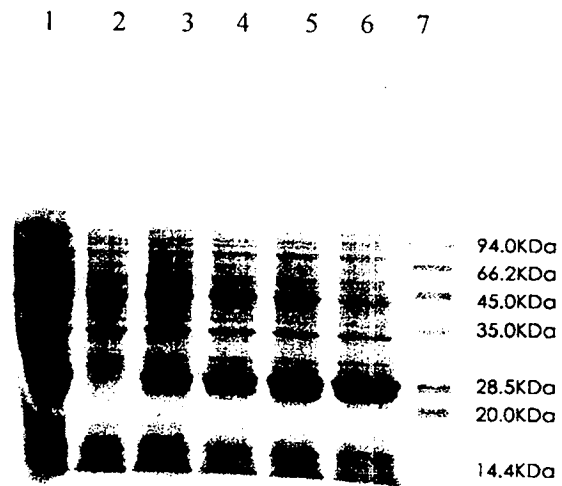


图 5 SDS-PAGE
检测 rAhpC
蛋白表达

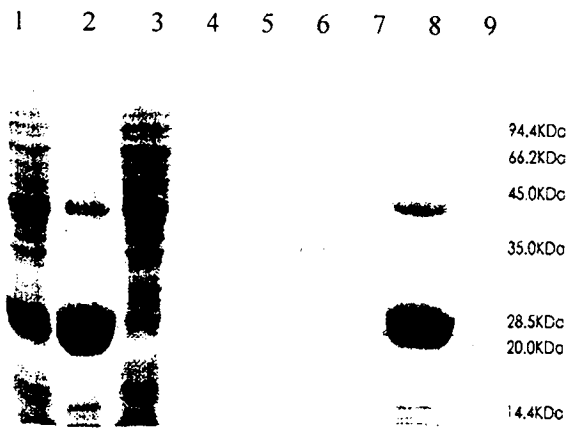


图 6 SDS-PAGE
鉴定 rAhpC
蛋白表达形式

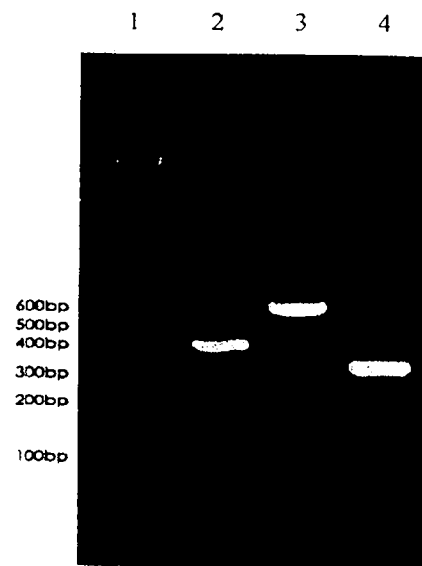


图 7 napA、ahpC、
1tB 基因 PCR
扩增结果

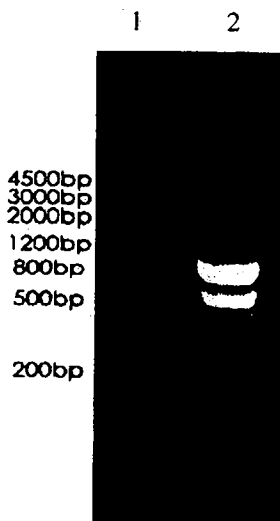


图 8 融合基因
ahpC-1tB 重叠延
伸 PCR 电泳结果

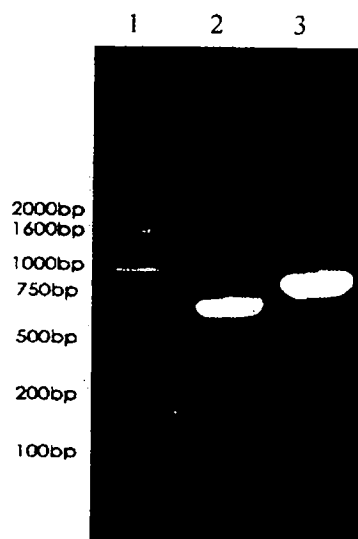


图 9 ahpC 基因片段、
napA-1tB 融合基因
PCR 电泳结果

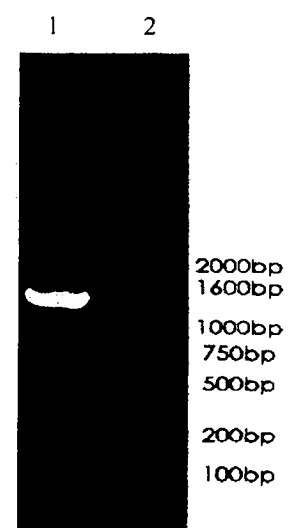


图 10 融合基因
ahpC-napA-1tB 重叠
延伸 PCR 电泳结果

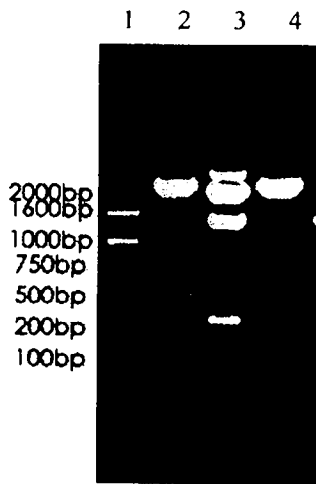


图 11 重组质粒 pMD18-T-ANL 酶切鉴定结果

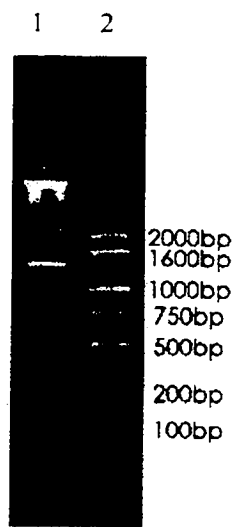


图 12 重组质粒 pET22b-ANL 酶切鉴定结果

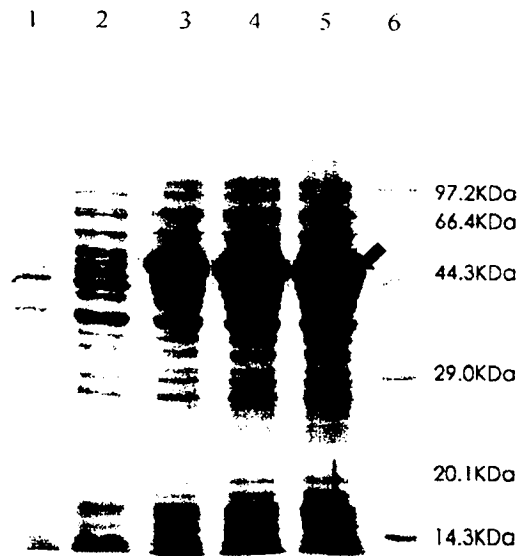


图 13 SDS-PAGE 检测 rANL 蛋白表达

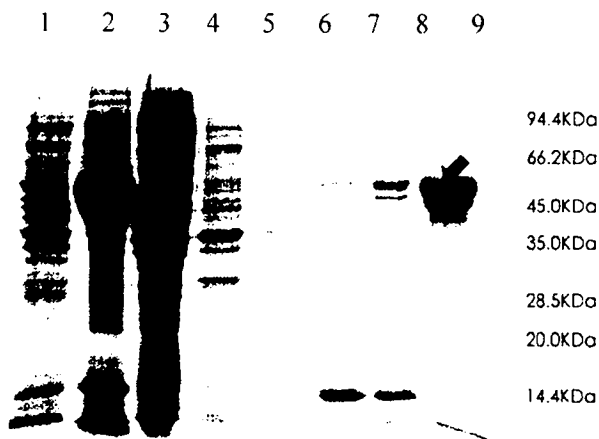


图 14 rANL 表达形式鉴定实验结果

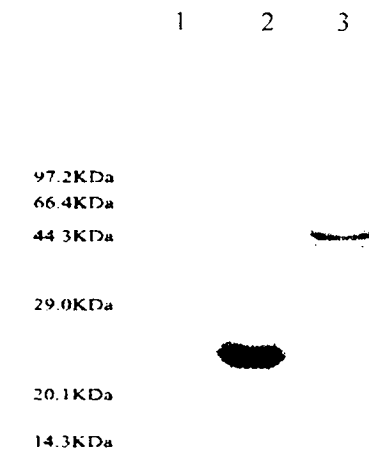


图 15 蛋白抗原质量鉴定 图 SDS-PAGE